Original Article

کلونینگ و بیان آنتی‌ژن LipL32 لپتوسپیرائی به عنوان کاندیدی برای تشخیص سریع بیماری

نوشین سهرابی [۱*]، شهره عظیمی [۲]

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تهران، واحد شهر جدید پردیس، تهران، ایران.
۲- گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مشکلات اصلی در بیماری لپتوسپیروزیس، دشواری تشخیص آن است که باعث شده این بیماری به عنوان یک چالش در سلامت انسان و دام مطرح باشد. با توجه به مشکلات موجود در آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) که روش معمول در تشخیص این عفونت است، تلاش‌های فراوانی در جهت طراحی و اجرای روش‌های دقیق و سریع تشخیصی انجام شده است. با توجه به این که پروتئین غشای خارجی LipL32 می‌تواند به عنوان کاندید مناسبی برای مصارف تشخیصی محسوب شوند، در این مطالعه قصد بر این است که این آنتی‌ژن را کلون و بیان نماییم.

مواد و روش‌ها: ابتدا ژن LipL32 بوسیله پرایمرهای اختصاصی و روش PCR تکثیر گردید و سپس در داخل وکتور بیانی pQE30 کلون گردید و با استفاده از آزمون‌های کنترلی جهت قرارگیری قطعه مربوطه مورد تایید قرار گرفت. برای بیان پروتئین مورد نظر، پلاسمید نوترکیب ایجاد شده در درون میزبان مناسب (*E.coli*M15)، وارد و سپس بیان شد.

نتایج: پروتئین بیان شده با استفاده از آزمون الکتروفورز SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و با تکنیک وسترن بلاتینگ و استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی، تائید شد.

نتیجه گیری: پروتئین نوترکیب LipL32 با موفقیت در سیستم پروکاریوتی بیان گردید. این پروتئین را می‌توان جهت طراحی روش‌های تشخیصی در عفونت‌های ناشی از لپتوسپیرا در دام یا انسان مورد استفاده قرار داد.

کلمات کلیدی: لپتوسپیروزیس، پروتئین نوترکیب، آنتی‌ژن LipL32، کلونینگ، بیان پروتئین.

مقدمه

لپتوسپیروزیس نوعی بیماری مسری و مشترک بین دام و انسان است که توسط اسپیروکت‌های متعلق به جنس لپتوسپیرا ایجاد می‌شود (۲-۱). سویه‌های بیماری‌زا، عضو گونه لپتوسپیرا اینتروگانس هستند و به سروگروپ‌های متعدد و بیش از ۲۵ سروار تقسیم بندی می‌شوند (۳). بیماری لپتوسپیروزیس در انسان توسط تماس مستقیم با حیوانات آلوده و یا توسط تماس غیرمستقیم با آب ،خاک مرطوب یا سبزیجات آلوده با ادرار حیوانات مبتلا به عفونت مزمن نظیر جوندگان، سگ‌ها وحیوانات اهلی منتقل می‌گردد (۴).

اگرچه لپتوسپیروزیس دارای انتشار جهانی است، اما بیشتر در مناطق گرمسیر و مناطق روستایی شایع است (۴-۳). این بیماری دارای شیوع نسبتا گسترده‌ای نیز در کشورمان می‌باشد (۵).

تشخیص اولیه عفونت لپتوسپیرا در انسان به خاطر شباهت علائم آن با دیگر بیماری‌های تب‌دار نظیر آنفلوآنزا، تب دانگ، مننژیت و هپاتیت بسیار مهم است (۴). بنابراین آزمون‌های تشخیصی آزمایشگاهی مناسب و سریع جهت شناسایی موارد بالینی برای درمان مناسب و مدیریت بیماری و برای تسهیل انجام سریع تحقیقات اپیدمی بیماری مورد نیاز می‌باشند. لپتوسپیروزیس سخت و شدید اگر به طورمناسب درمان نشود، ممکن است با مرگ و میر بالائی همراه باشد (۲).

روش استاندارد تشخیصی بیماری، همانند سایر عفونت‌های باکتریال، کشت و جداسازی عامل بیماری است. اما از آنجائی که این عمل زمان زیادی به طول می‌انجامد، لذا تشخیص آزمایشگاهی لپتوسپیروزیس به طور عمده بر اساس روش‌های سرولوژیک می‌باشد (۶).

آزمون میکروسکوپی آگلوتیناسیون (MAT) روش مرجع تشخیصی لپتوسپیرا است که براساس وجود آنتی‌بادی اختصاصی و سروگروپ خاص تشخیص داده می‌شود. از آنجا که در ۱۰-۸ روز اولیه بیماری، آنتی‌بادی اختصاصی قابل ردیابی نخواهد بود لذا ارزش این روش در تشخیص سریع بیماری زیر سوال می‌رود (۳ و۶). از سایر معایب این روش می‌توان به استفاده از سویه‌های مختلف لپتوسپیرا به میزان زیاد و به صورت زنده اشاره کرد که برای کارکنان آزمایشگاه با خطر فراوانی همراه است (۶). بنابراین روش MAT تنها در چند آزمایشگاه رفرانس انجام می‌شود و سایر روش‌های ایمونولوژیک نظیر تست آگلوتیناسیون لامی ماکروسکوپی (MSAT)، ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFA)، و الیزا که نیازی به لپتوسپیرای زنده ندارند، بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرند (۸-۷). با توجه به این که در اکثر این روش‌ها از آنتی‌ژن‌های استخراج شده از ارگانیسم استفاده می‌شود، لذا امکان نتایج مثبت کاذب با دیگر بیماری‌ها وجود دارد (۵). به همین دلیل تلاش‌های

* **نویسنده مسئول: نوشین سهرابی**، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تهران، واحد شهرجدید پردیس، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱۷۶۲۴۳۱۳۸
Email: nsohrabi75@yahoo.com

فراوانی برای طراحی و اجرای آزمون‌های تشخیصی حساس و سریع بر پایه آنتی‌ژن‌های اختصاصی باکتری انجام شده است تا از آن‌ها برای اجرای روش‌های دقیق و سریع تشخیصی استفاده شود.

پروتئین‌های غشای خارجی لپتوسپیرا (OMP) به میزان بالائی در سطح سلولی باکتری ثابت مانده‌اند و تغییر نمی‌کنند و در طی عفونت در بدن میزبان بیان می‌شوند (۹). بنابراین در تشخیص سرولوژیک لپتوسپیروزیس اهمیت ویژه‌ای دارند. پروتئین‌های غشاء خارجی نظیر LipL41، LipL32 و LipL21 تنها در گونه‌های بیماریزای لپتوسپیرا بیان می‌شوند و در بیش از ۲۰۰ سروار لپتوسپیرا به طور ثابت مانده‌اند (۱۰).

در این بین، پروتئین غشای خارجی ۳۲ کیلو دالتونی (LipL32)، که یکی از OMP های شناخته شده است، به عنوان شاخص تشخیص سرولوژیکی در تشخیص و جداسازی عفونت لپتوسپیرائی معرفی و به کار گرفته شده است (۱۱-۱۲).

هدف از مطالعه حال حاضر، جداسازی و کلون نمودن ژن کد کننده LipL32 از لپتوسپیرا و بیان پروتئین نوترکیب آن در یک سیستم پروکاریوتی می‌باشد تا پروتئین فوق در روش‌های تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد وروش‌ها

کشت باکتری و استخراج DNA: در این پژوهش، لپتوسپیرا اینتروگانس سروار ایکتروهموراژی از بانک میکروبی آمریکا، از انستیتو پاستور ایران تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. باکتری در ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط EMJH (Ellinghausen McCullough Joh-son and Harris medium) حاوی آلبومین سرم گاوی، توئین ۸۰ (شرکت Difco) کشت داده شد. سپس DNA باکتری رشد یافته توسط کیت تجاری (شرکت سیناژن) استخراج گردید.

طراحی پرایمر برای ژن Lip L32 وانجام PCR: برای طراحی پرایمر، توالی ژن‌های مورد نظر از بانک ژنی NCBI استخراج شد. سپس براساس توالی ژن، پرایمرها توسط شرکت سیناژن طراحی گردید. این پرایمرها واجد جایگاه برش آنزیم‌های Hind III و Bgl II بودند. سپس واکنش PCR درحجم نهائی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۰/۵ میکرومول از هر پرایمر، ۵ میکرولیتر بافر PCR (۵X) واجد $MgSO_4$، ۰/۲ میلی‌مول از هر dNTP، ۱/۵ واحد آنزیم pfu DNA پلیمراز و ۲۰۰ نانوگرم از DNA الگو انجام شد.

PCR شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد، دناتوراسیون ثانویه برای ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال پرایمر ۴۵ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد، گسترش DNA به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳۵ چرخه وگسترش نهائی ۱۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. پس از انجام واکنش، تکثیر محصول مورد نظر از طریق الکتروفورز در ژل آگاروز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و مشاهده زیر نور uv آشکار و سپس محصول با استفاده از سایز مارکر ارزیابی شدند.

کلون سازی: ژن LipL32 پس از برش با آنزیم‌های محدودالاثر Hind III و Bgl II، به وسیله آنزیم T4 لیگاز در پلاسمید pQE30 کلون شد. پلاسمیدهای نوترکیب حاصل به روش شوک حرارتی به درون باکتری صلاحیت دارشده *Ecoli* M15، به عنوان میزبان بیانی، منتقل شدند.

از آنجا که پلاسمید فوق دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و کانامایسین است، لذا جهت اطمینان از ورود پلاسمید نوترکیب، باکتری داخل محیط کشت LB حاوی ۷۰ ml /gμ آمپی‌سیلین و ۵۰ ml /gμ کانامایسین کشت داده شده و ظهور کلنی‌ها پس از یک شب در محیط کشت نشانه حضور پلاسمید در باکتری است.

پلاسمیدهای نوترکیب توسط کیت تجاری (شرکت سینا ژن) استخراج و با استفاده از هضم آنزیمی و واکنش PCR برای حضور ژن مورد نظر بررسی گردیدند. توالی اسیدهای نوکلئیک ژن مذکور نیز تعیین و با اطلاعات موجود در GenBank مقایسه شد.

بیان، تخلیص و تائید پروتئین: برای بیان پروتئین نوترکیب، ۰/۵ میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری واجد پلاسمید نوترکیب را در محیط کشت LB جدید حاوی۵۰ ml /gμ آمپی‌سیلین و ۵۰ ml/gμ کانامایسین کشت داده شد و پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوادهی با دور ۲۵۰، جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ رسید. بیان پروتئین در این زمان با اضافه نمودن ۰/۱ میلی‌لیتر از IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)، یک میلی‌مولار القا گردید. میزان بیان، هر یک ساعت پس از القا تا ۴ ساعت متوالی با روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. برای این عمل ژل پلی آکریل امید جداکننده ۱۲/۵٪ مورد استفاده قرار گرفت که در نهایت به وسیله روش کوماسی بلو رنگ آمیزی شد.

با توجه به این که قطعه ژنی کلون شده در ناحیه انتهائی آمینی خود دارای توالی HIS-tag× 6 است، پروتئین بیان شده LipL32 که همراه با His-tag می‌باشد، بوسیله کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از ستون دارای رزین نیکل (Ni^{2+}) تخلیص گردید. پروتئین نوترکیب تخلیص شده در واکنش با آنتی‌بادی منوکلونال Anti-histidin توسط ایمونوبلاتینگ (وسترن بلات) مورد بررسی قرار گرفت.

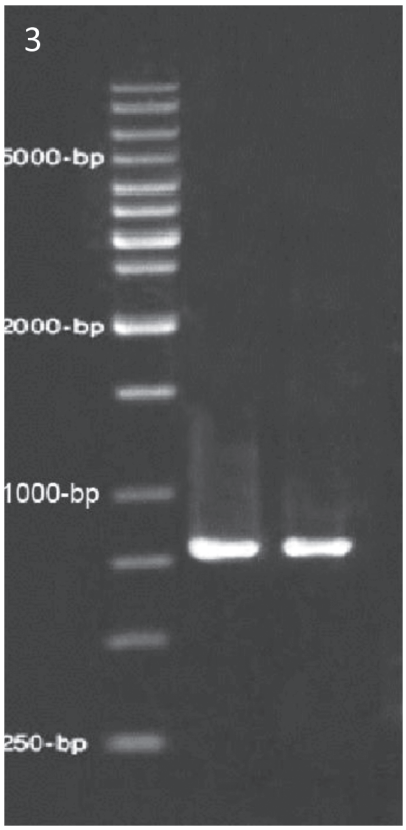
نتایج

پس از استخراج DNA از کلنی‌های رشد یافته لپتوسپیرا اینتروگانس واریته ایکتروهموراژی، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بر روی ژن LipL32 انجام گرفت. باند مربوط به ژن تکثیر شده بر روی ژل آگاروز ۱٪ مشاهده و اندازه آن که شامل ۷۷۸ جفت باز بود، از طریق مقایسه با مارکر مولکولی استاندارد تائید شد (شکل ۱). توالی اسیدنوکلئیک ژن کلون شده با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت و بیشترین میزان مشابهت (۹۸٪) با توالی ثبت شده به شماره AY423075 مشاهده شد (نتایج نشان داده نشده است).

بیان پروتئین در باکتری‌های تحریک شده با IPTG یک میلی‌مولار تا ۴ ساعت بعد از القاء ردیابی وپروتئین در حدود وزنی پیش‌بینی شده (۳۲ کیلودالتون)، مشاهده شد (شکل ۲). زمان مناسب جهت القا توسط IPTG برای بالاترین میزان بیان پروتئین، ۲ ساعت بود.

پروتئین نوترکیب ایجاد شده به روش کروماتوگرافی تمایلی و با خلوص بالایی تخلیص شد (شکل ۳) و بوسیله آنتی‌بادی علیه His-tag در

مجاورت کنترل منفی و با روش وسترن بلات تائید گردید (شکل ۴).

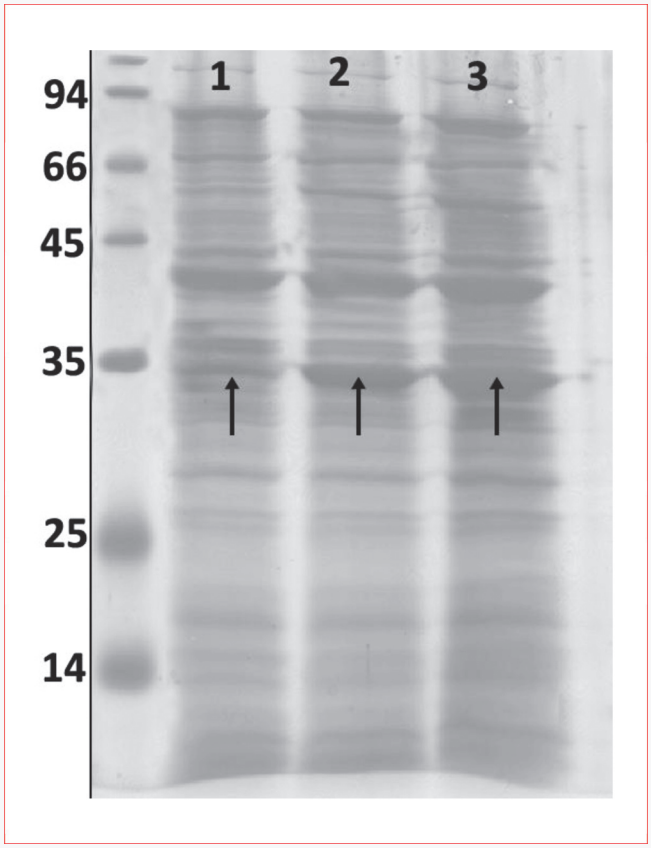


شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR برروی ژل آگاروز یک درصد
ستون۱ مارکر وزن ملکولی، ستون ۲ و ۳: قطعات تکثیر شده ژن LipL32 با پرایمرهای اختصاصی (۷۷۸ جفت باز)

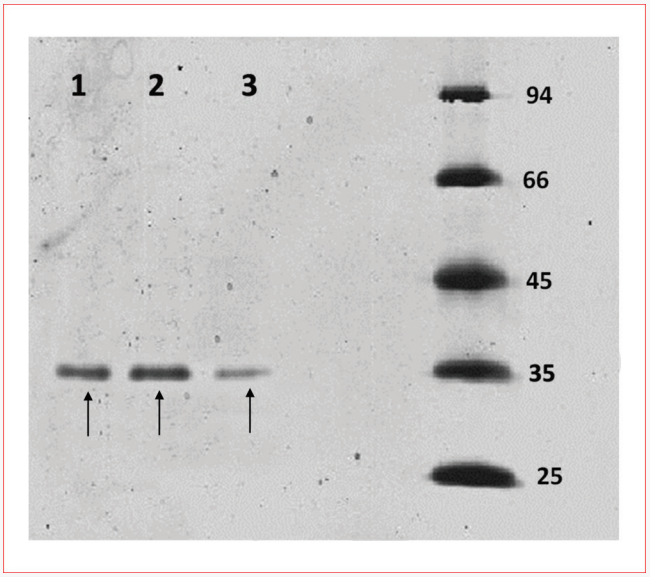
بحث و نتیجه‌گیری

لپتوسپیروزیس یک بیماری عفونی مشترک بین دام و انسان است که در کشور ایران نیز به ویژه در مناطق روستایی به وفور گزارش گردیده است (۵). جهت کنترل لپتوسپیروزیس، تشخیص سریع حیوانات و واکسیناسیون از مهمترین برنامه‌ها در کنترل بیماری هستند. لذا جلوگیری از لپتوسپیروزیس انسانی وابسته به کنترل بیماری در حیوانات است (۳).

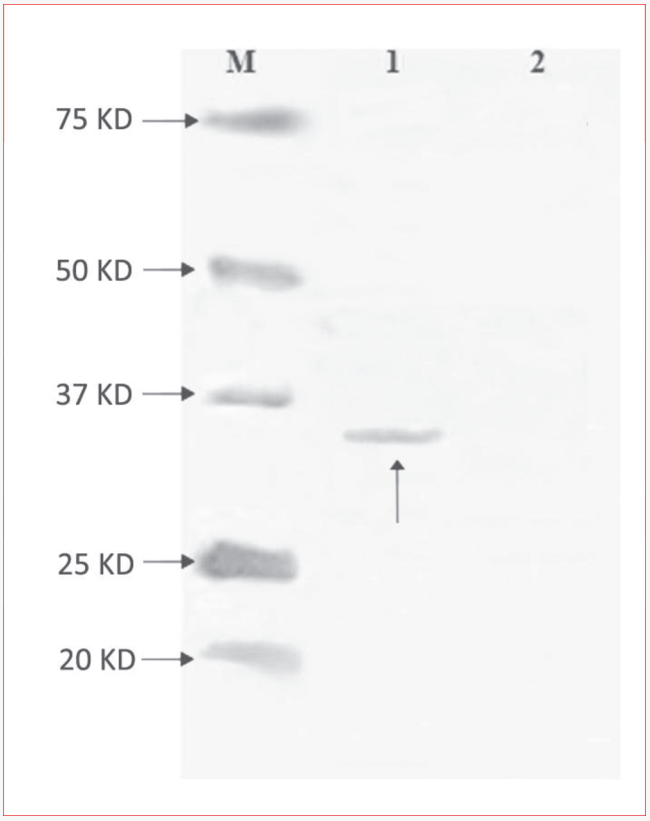
بنابراین، روش‌های تشخیصی نه تنها بایستی اختصاصی باشند بلکه باید بتوانند در زمان اندکی جهت مصرف آنتی بیوتیک و درمان سریع، بیماری را تشخیص دهند. اغلب آزمون‌های تشخیصی مورد استفاده، روش‌های ایمونولوژیکی هستند که هرکدام دارای معایبی هستند (۶). در بسیاری از موارد، واکنش‌های مثبت کاذب در نمونه‌های بیماران مبتلا به دیگر بیماری‌ها نظیر هپاتیت، سیفلیس، تب دانگ، عفونت با ویروس‌های سیتومگالوویروس، اپشتین بار ویروس مشاهده گردیده است (۶). به همین دلیل جهت ایجاد روش اختصاصی‌تر برای تشخیص آزمایشگاهی لپتوسپیروزیس، تخلیص آنتی‌ژن‌ها مرحله کلیدی در طراحی روش‌های تشخیصی است. پروتئین‌های غشاء



شکل۲ الکتروفورز لیز سلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب pQE30-LipL32 و ارزیابی بیان پروتئین نوترکیب LipL32 بر روی ژل ۱۲/۵% SDS- PAGE: در قبل از القا (ستون ۱) و یک و دو ساعت بعد از القا (ستون ۲و ۳) با IPTG
ستون:۱ مارکر مخصوص SDS-PAGE



شکل۳۳ ارزیابی تخلیص پروتئین rLipL32 بوسیله SDS- PAGE. تخلیص پروتئین در ستون‌های مختلف ۱و ۲ و ۳ بعد از تخلیص



شکل۴ بررسی وسترن بلاتینگ پروتئین‌های تخلیص شده rLipL32 با اگارز Ni-NTA بصورت Denaturing در مقابل آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه توالی پلی هیستیدین (His-taq).
ستون ۱: نمونه تخلیص شده پروتئین نوترکیب rLipL32، ستون۲: کنترل منفی

خارجی لپتوسپیرا به جهت موقعیت خاص آن‌ها در سطح سلول، به سهولت در دسترس سیستم ایمنی قرارمی‌گیرند و به همین دلیل به طور گسترده به عنوان آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زا و محافظتی شناسائی شده اند (۸). بنابراین در تولید روش‌های تشخیصی و واکسن‌ها می‌توانند آنتی‌ژن‌های سودمندی باشند (۹ و ۱۳). این پروتئین‌ها شامل LipL32،LipL36،LipL41،LipL48 و همچنین پروتئین‌های دیگری با وزن مولکولی کمتر می‌باشند (۸).

پروتئین LipL32 به عنوان یکی از آنتی‌ژن‌های غشاء خارجی لپتوسپیرا است که ساختار آن به میزان زیادی در انواع بیماری‌زا ثابت مانده و مشخص گردیده است که درتوبول‌های پروگزیمال حیوانات آلوده، خصوصا در فاز حاد و مزمن بیماری به میزان بالائی بیان می‌شود (۱۲) و به همین دلیل می‌تواند در آزمون‌های تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد (۱۴). تهیه این پروتئین از پیکره باکتری لپتوسپیرا نیاز به کشت انبوه باکتری و جداسازی و تخلیص پروتئین دارد که کل این فرایند بسیار دشوار و خطرآفرین است. علاوه بر آن، میزان پروتئین بدست آمده معمولا در حد قابل توجه و به صرفه نمی‌باشد. به همین دلیل روش‌های نوترکیب برای تولید این پروتئین مورد استفاده قرار گرفته است تا میزان زیادی از این پروتئین در شرایط آزمایشگاهی تولید شود. مطالعات متعدد گذشته نیز نشان دهنده موفقیت آمیز بودن بیان پروتئین فوق از سویه‌های مختلف لپتوسپیرا، در سیستم‌های پروکاریوت بوده‌اند (۱۵-۱۸). البته یکی از معضلات تولید انبوه این پروتئین نوترکیب، خاصیت توکسیک آن برای باکتری‌های *E. coli* میزبان است که باعث ایجاد محدودیت‌هایی خواهد شد (۱۹).

در این مطالعه، از وکتور بیانی pQE30 استفاده شده است که ضمن کار آمدی و سازگاری بالا با ژن کلون شده، دارای شرایط بیانی و بازدهی قابل قبولی است و ضمن دارا بودن توالی his-taq می‌تواند شرایط تخلیص را هم بسیار تسهیل نماید.

با توجه به موارد فوق، نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که پروتئین نوترکیب LipL32 لپتوسپیرا با موفقیت تولید و تخلیص شده است که صحت نتایج نیز در موارد متعدد با استفاده از روش‌های مناسب از جمله الکتروفورز و وسترن بلات تایید گردیده است.

پروتئین نوترکیب بدست آمده در این تحقیق می‌تواند برای مقاصد تشخیصی، که در مطالعات متعددی بر آن تاکید شده است (۲۰)، مورد استفاده قرار گیرد. لازم به ذکر است که برای این منظور شرایط بیان و تخلیص برای حجم‌های بالاتر باید بهینه و اصلاح گردد.

References

1. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis. 2003; 3(12):757-71.
2. Fain S. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization Publishing 2003; 1-23.
3. Vinetz JM. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis. 2001;14(5):527-38
4. Adler B, de la Pena Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. Vet Microbiol. 2009; 140 (3-4):287–296.
5. Rafiei A, Hedayati Zadeh omran A, Babamahmoodi F, Alizadeh R, Valadan R. Review of Leptospirosis in Iran. J Mazandaran Univ Med Sci. 2012, 22(94): 102-110 (in-Persian)
6. Hartskeerl RA. Manual for Diagnosis of Leptospirosis. KIT Biomedical Research. Netherland. 2004; P. 34-60.
7. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, et al. Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of Leptospirosis. J Clin Microbiol. 2001; 39(9):3303-3310.
8. Smits HL, van der Hoorn MA, Goris MG, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, et al. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. J Clin Microbiol. 2000; 38(3): 1272-1275.
9. Haake DA, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. Infect Immun. 2002; 70(9): 4936–4945.
10. Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. FEMS Microbiol Rev. 2004; 28(3): 291–318.

11. Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of Leptospira spp. and Pseudoalteromonas tunicata. Infect Immun. 2008; 76(5): 2063–2069.
12. Pinne M, Haake DA. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of Leptospira interrogans: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. PLoS One. 2013; 8(1): e51025.
13. Chang YF, Chen CS, Palaniappan RU, He H, McDonough SP, Barr SC. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. Vaccine. 2007; 25(48):8190–7.
14. Dey S, Mohan CM, Kumar TM, Ramadass P, Nainar AM, Nachimuthu K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. Vet Microbiol. 2004;103(1-2):99-106.
15. Boonsathorn N, Konghom G, Mongkolsiri K, Jirapongwattana C, Balachandra K, Naigowit P, Sawanpanyalert P. Expression and characterization of recombinant leptospiral outer membrane protein LipL32 from Leptospira interrogans serovar autumnalis.Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2009; 40(1):155-61.
16. Hauk P, Carvalho E, Ho PL. Expression and purification of the non-tagged LipL32 of pathogenic Leptospira,Braz. J Med Biol Res. 2011; 44(4): 297-302
17. Krishna SV, Joseph S, Ambily R, Mini M, Anto L, Mohan SG. Cloning and sequencing of the virulent gene LipL32 of Leptospira interrogans serovar Autumnalis. Vet World. 2013; 6(4): 193-195.
18. Amutha R, Chaudhary P, Garg AP, Vasan P, Cheema PS , Srivastava SK. Cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL32 of Leptospira interrogans serovar Sejroe. Vet Res Comm. 2007; 31(5): 513-519.
19. Shang ES, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock RE, et al. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic leptospira species is a heat-modifiable porin. Infect Immun. 1995; 63(8): 3174-81.
20. Bomfim MRS, Kob A, Koury MC. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of bovine leptosprirosis. Vet Microbiol. 2005; 109(1-2): 89-94.

Original Article

Cloning and Expression of Leptospira LipL32 Antigen as a Candidate for Rapid Diagnosis

Sohrabi N[1*], Azimi Sh[2]

1- Department of Biology, Payam-e-Noor University, Tehran Branch, Pardis, Iran.
2- Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, karaj, Iran.

Received: 05 Mar 2013 Accepted: 16 Jun 2013

Abstract

Background & Objective: Leptospirosis as an important emerging infectious zoonotic disease caused by spirochetes of the genus *Leptospira*. Given the low sensitivity and long duration of its culture, the diagnosis of leptospirosis is mainly based on serological methods. The microscopic agglutination test (MAT) is considered as the reference method. Because of the complexity of the MAT, there is an urgent need for the development of new reliable and rapid screening tests for leptospirosis. Major leptospiral outer membrane proteins (OMPs), present only in pathologic strains, could be regarded as a good candidate for diagnostic studies. Here we report the cloning and expression of LipL32, as a prominent immunogenic protein, in a prokaryotic system.

Materials and Methods: After the amplification of LipL32 gene, it was cloned into the pQE30 vector. The insertion of LipL32 gene into the vector was screened and confirmed with restriction analysis and sequencing. The recombinant plasmid was transformed into E. coli M15 strain, and the expressed protein was identified by SDS-PAGE and western blotting. This recombinant protein with 6× His-tagged sequence was purified using Ni-NTA affinity column chromatography.

Results: The results revealed that the selected gene was successfully cloned in pQE30 vector and recombinant protein (rLipL32) of approximately ~32 kDa was produced, purified and confirmed by western blotting.

Conclusion: This recombinant protein could be potentially used for the development of serodiagnosis tests for the diagnosis of leptospirosis in humans and animals.

Keywords: **Leptospirosis; Recombinant protein; Cloning; LipL32; Protein expression**

*** Corresponding author: Sohrabi Nooshin,** Department of Biology, Payam-e-Noor University, Tehran Branch, Pardis, Iran.
Tel: +98 9128031656
E-mail: nsohrabi75@yahoo.com